

University of Groningen

## Subunit topology in the V type ATPase and related enzymes

Chaban, Yuriy

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Chaban, Y. (2005). *Subunit topology in the V type ATPase and related enzymes*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## CHAPTER VI

### General discussion

In this thesis we describe the overall architecture and subunit topology of the V- and A-ATPase complexes. In order to attain our objectives, we compared electron microscopy 2D maps of complexes with defined subunit compositions (Chapters II-V). Several three-dimensional reconstructions of the V-ATPase complexes and subcomplexes have been reported (Radermacher et al., 2001; Wilkens & Forgac, 2001; Domgall et al., 2002; Murata et al., 2003; Zhang et al., 2003; Bernal & Stock, 2004; Coskun et al., 2004b; Wilkens et al., 2004). Therefore, it is a challenge to combine our data and understanding of the V-ATPase topology with the present 3D information.

In Chapter II of this thesis we have described the position of two subunits in the V-ATPase of the prokaryote *Caloramator fervidus*. Unfortunately, at the time of the experiments only one subunit, the C subunit, could be determined unambiguously. Subunit E was assigned only tentatively, because subunit D, which has about the same molecular weight and electrophoretic mobility could not be ruled out (Chaban et al., 2002). Recently, sequence information on the *C. fervidus* V-ATPase D and E subunits became available, which confirms our previous assignment (Juke S. Lolkema, personal communication).

#### **VI-1. An additional density at the E/C subunit interface in the V<sub>1</sub> subcomplexes of *Caloramator fervidus***

Difference mapping of a number of *C. fervidus* V<sub>1</sub> subcomplexes differing in subunit composition made it possible to identify the shape of the E and C subunits. It was assumed that the shape of the *C. fervidus* subunit C is similar to the C subunits of other prokaryotic V-ATPases and the analogous d subunit (Vma6p) of eukaryotic V-ATPases. A high-resolution model of the *Thermus thermophilus* C subunit became recently available (Iwata et al., 2004) and hence reliable docking of the subunit C coordinates into the V-ATPase three dimensional structure should be possible (Fig. VI-1A). We have compared the electron density assigned to the C subunit in the *C. fervidus* V-ATPase (Chapter II) to the high-resolution structure of C-subunit. A comparison of the electron microscopy map shown in FigVI-1B, C, p. 44, and the projected X-ray structure in similar position leaves little doubt that most of the EM map represents subunit C, since it has a similar shape and size (for details see Section I-3.3.9.). However, the docking of the X-Ray data into the electron density map revealed that there must be an additional density on the top of the subunit C (Figure VI-1B, C, yellow arrows). At the moment, it is not clear whether this density represents a conformational difference in the subunit structure or indicates the presence of other elements in this region, besides subunits C and E. Since the size of the *C. fervidus* and *T. thermophilus* subunits does not differ significantly (Ubbink-Kok et al., 2000; Iwata et al., 2004) we favor the latter possibility. Potential candidates for the additional density are the “impurities” present on the SDS PAGE of the V<sub>1</sub>-fragments (Figure II-3, asterisk).

We have shown in Section I-3 that V-ATPase subunits potentially can interact with a number of cellular proteins. These interactions still remain poorly understood, but were suggested to be an

important step in V-ATPase regulation and targeting. We suggest that an additional density in the stalk region might represent one of such interactions, which weakens upon the disassembly of the E and C subunits. Another explanation for the additional density in the stalk region is the presence in V<sub>1</sub>-ATPase fractions of the G subunit, which at the time of the experiments was not suggested to be a part of the V<sub>1</sub> complexes (see Section II-3.1.). Nevertheless, we cannot exclude that some of the A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>EC complexes contained also subunit G that dissociated during further complex degradation. The *C. fervidus* subunit G in prokaryotes corresponds to the eukaryotic subunit F (Vma7p). A close proximity of subunits F and E was suggested by cross-linking experiments (Grüber et al., 2000b). The position of the subunit F in the central stalk is also supported by a number of experiments including subunit rotation and antibody labeling (Aviezer-Hagai, 2003; Imamura et al., 2003; for details see Section I-3.3.6.). There is an indication that subunit C can be cross-linked to the F-subunit at the position of the Thr105 (Fig. VI-1C, red arrow; Iwata et al., 2004) The position of the F subunit at the interface of the subunits E and C would be also in line with the suggestion that Vma7p is an analogue of the F-ATPase subunit  $\epsilon$  (Jones et al., 2001).

## VI-2. The enigma of the stalk region

The position and function of subunit E was discussed in Chapter III of this thesis. Fig.VI-2, p. 44, demonstrates a remarkable similarity in the organization of the  $\alpha_3\beta_3$ EG subcomplex and  $\alpha_3\beta_3\gamma$  subcomplex of bovine F-ATPase. The density in the lower part of the central stalk region was assigned to subunit G. The ability of the E and G subunits to form a complex was demonstrated by a number of experiments (see Section I-3.3.7). Due to the similarity to the V-ATPase subunit G to the F-type subunit b, a model was proposed where subunit G plays the role of the peripheral stalk. (Hunt & Bowman, 1997). Such a model seems to exclude the interaction between subunits E and G, since subunit E was suggested to be the coupling subunit, analogous to the  $\gamma$  subunit (Chapter III). A clue to solve this problem might be data of Grüber et al., 2000b, which show that a zero-length cross-link could be formed between subunits E and G when the enzyme is in the CaATP bound form, but no cross-link between these subunits could be obtained in the trapped CaADP form. This implies a rearrangement of both subunits during ATP hydrolysis, which could change the character of their interaction.

Recently published data on the 3-D structure of the *S. cerevisiae* A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>(C)DEFG(H) complex suggest the presence of a protrusion on one side of the central stalk density in a position similar to the F/V-ATPase  $\alpha_3\beta_3$ EG hybrid complex (red arrow, Fig. VI-2C). We propose that this density at least in part belongs to the G subunit.

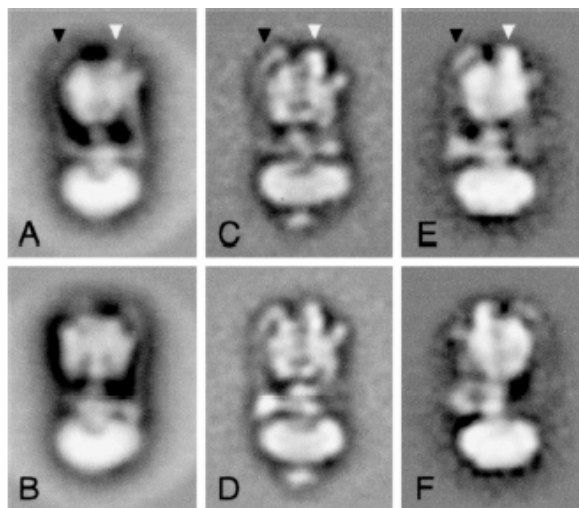
The electron density maps of the V- and A-ATPases suggest that at least one of the peripheral stalks comes in close contact with the central stalk subunits, while its connection to the V<sub>0</sub> subunits is not obvious. This peripheral stalk often seems to be less tightly bound to the top of the A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> hexamer than to the membrane-bound V<sub>0</sub> part (Y. Chaban, Ü Coskun, unpublished observations). Since the V-ATPase subunit G differs from the F-ATPase subunit b by the absence of the hydrophobic fragment, we speculate that this peripheral stalk consists of the subunit G dimer. The second peripheral stalk in this case might be represented by the hydrophobic part of subunit a, as was suggested from the 3-D structure of the V-ATPases (Domgall et al., 2002; Wilkens et al., 2004). Subunit D of the V-ATPase complex was suggested to play the role of the coupling subunit analogous to F-ATPase subunit  $\gamma$ . In favor of this hypothesis is its capability to undergo rotation during ATP hydrolysis by the immobilized A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> hexamer. In our model, we propose that subunit D

closely interacts with subunit E forming the central stalk in the V-ATPases. In favor of this hypothesis is a 3-D model of the *Manduca sexta* V-ATPase, showing a large and solid central stalk density (Radermacher et al., 2004). This is also in line with our observations concerning the position of subunit F (Section VI-1), since a cross-linking between subunits D and F was demonstrated (Xu et al., 1999).

Another reason for the location of both E and D subunits in the central stalk region is an apparent discrepancy between the data on the A- and V-ATPases. The overall structure of the A-ATPase, described in the Chapter V, is rather similar to that for the V-ATPase complex. It has been shown that subunit D plays the role of the coupling subunit in both A-ATPase of *Methanococcus jannaschii* and ATP synthase of *Thermus thermophilus*. These data are controversial with our observations described in Chapters II and III. On the other hand, subunits E and D of Archaea, and Eukaryotes might sufficiently differ in their primary sequence to allow the enzymes to be functionally different (Lolkema et al., 2003). A significant change in the function of the central stalk  $\epsilon$ -subunit in the F-ATPase of different species was recently proposed (Hausrath et al., 2001; Weber & Senior, 2003). Here, we speculate that the discrepancy in the assignment of the coupling subunits between the A- and V-ATPases reflects evolutionary changes in the functions of these subunits within the central stalk region.

An intriguing question is the role and position of the C subunit of the V-ATPase. Comparison of the V-ATPase projections from the prokaryotic and eukaryotic organisms demonstrates a substantially higher density in the stalk region of the latter (Fig. VI-3). This is in line with our data that the intrinsic eukaryotic V-ATPase subunit C (Vma5p) is located at the tip of the V<sub>1</sub>-stalk region (Chapter IV). Such a position of the C subunit could be also suggested from its possible regulatory role in the reversible disassembly of V-ATPase complexes (Kane et al., 2000; Armbrüster et al., in press).

Another subunit assigned to the stalk region is subunit H. This subunit was detected as an element of the peripheral stalks in the 3-D reconstruction of the V-ATPase complexes from the plant tonoplast and bovine brain (Domgall et al., 2002; Wilkens et al., 2004). However, the interaction of the H subunit with the other elements of the V-ATPase complex is not very clear.



**Figure VI-3\*.** Comparison of side-view projections from different V-ATPases. **A, B**, selected side views from *Caloramator fervidus*. **C, D**, views from bovine brain clathrin-coated vesicles. **E, F**, views of V-ATPase from plant tonoplasts. The frames **A, C**, and **E** show the V<sub>0</sub> headpieces in relatively similar positions. On the left side, similar-shaped connecting stalks are visible. Black arrowheads indicate the positions where these connecting stalks attach to the top of the headpiece. Densities marked with white arrowheads are considered to be the end of a second connecting stalk. The V-ATPase from bovine brain shows the additional Ac45 subunit, as a protruding density at its base (**C, D**).

\* From Lolkema et al., 2003

### VI-3. Concluding remarks

The available electron microscopy and other data on V- and A-ATPase complexes suggest that further analysis is necessary for a consistent assignment of all the stalk subunits. Comparisons of particles differing in subunit composition, as described in this thesis, should be extended. Another way to tackle the subunit topology would be particle labeling with small metal (gold) clusters attached to specific subunit sites, as has been performed with other large membrane protein complexes. On the other hand, the ultimate goal would be to solve the full structure by X-ray diffraction. But it is not certain that V-ATPases with a complete set of peripheral stalk subunits will be stable enough for crystallization. Probably, a hybrid approach between X-ray and EM could be the most profitable one. If EM could provide a 3-D structure at medium-resolution ( $\sim 8\text{\AA}$ ), high-resolution components solved by X-ray diffraction could be fitted in. There are already a number of examples where this approach has been successfully applied.

### Notes added in proof

Science does not stop. And some crucial developments in the field have occurred between the time when this manuscript was written and its defence. I have to mention here at least two, which might have a significant impact on our knowledge of the topic. These are recent articles by Murata et al., 2005, and Meier et al., 2005, published in Science, vol. 308.

Murata et al., 2005, describe the structure of the rotor ring of the V type  $\text{Na}^+$ -ATPase from *Enterococcus hirae* derived to resolution 2.1 Å by x-ray crystallography. The high resolution model describes the structure of the individual subunits and sodium ion binding site, which positioned in the middle of the ring, far into lipid bilayer. The  $\text{Na}^+$ -binding pocket is formed by residues of three out of five  $\alpha$  helices, H2, H3 and H4. Surprisingly, the rotor ring contains ten K subunits, instead of seven, as it was reported previously on the basis of electron microscopy and single particle averaging data (Murata et al., 2003). A proper explanation of this discrepancy remains to be found, but 10 fold symmetry of the V-ATPase rotor ring significantly differs from the accepted 6-7 subunit model and, if confirmed, might change our view of these group of enzymes.

Meier et al., 2005, describe the x-ray crystal structure of the rotor ring of the  $\text{Na}^+$ -translocating F type ATP synthase at 2.4 Å resolution. The rotor consists of eleven c subunits, the individual subunits are well resolved. The sodium binding site is approximately in the middle of the lipid bilayer, position of which was deduced from earlier electron crystallography studies (Vonck et al., 2002) and amino acid sequence. The  $\text{Na}^+$ -binding site is formed by two neighboring c subunits and bound sodium ion is surrounded by the network of hydrogen bonds. The authors stress, that none of the amino acids involved in  $\text{Na}^+$ -binding is conserved in proton translocating F-ATP synthases. Nevertheless, proton- and  $\text{Na}^+$ - driven  $\text{F}_0$  motors must share the same basic structure because of the demonstration that chimeric ATP synthases are functional.

Undoubtedly, both these works are of great significance since they provide new data for understanding the mechanism of V-, F- and A-ATPases, provide material for molecular dynamic simulation experiments and new structural studies.

# Samenvatting

Het F-type, A-type en V-type ATPase zijn grote complexen, die uit meerdere subeenheden zijn opgebouwd. Ze koppelen het transport van protonen aan de synthese of de hydrolyse van ATP. Ze zijn ongeveer op dezelfde manier opgebouwd en hebben ook eenzelfde katalytische werking die gebaseerd is op rotatie van bepaalde componenten. Alle drie enzymen hebben een hydrofiel katalytisch domein, dat met  $F_1$ ,  $A_1$  of  $V_1$  wordt aangeduid. Ze hebben een massa van ongeveer 400 kDa. Dit domein is door middel van een domein met enkele stelen met een massa van 50-100 kDa verbonden aan een hydrofoob domein dat in de membraan is gebonden. Dit is het  $F_0$ ,  $A_0$  of  $V_0$  domein, dat een massa van ongeveer 200 kDa heeft. Het F-type ATPase, ook kortweg F-ATPase genaamd, functioneert gewoonlijk als een ATP synthase, dus een enzym dat de synthese van ATP katalyseert. Het is talrijk in de mitochondriën van eukaryoten. Het gevormde ATP wordt voor allerlei processen gebruikt om cellen en organismen te kunnen onderhouden en te laten groeien. De energie om ATP te synthetiseren wordt geleverd door een protonengradiënt over de binnenmembraan. Deze gradiënt wordt op zijn beurt gevoed door eiwitten van de ademhalingsketen, zoals NADH oxidoreductase, cytochroom reductase en cytochroom oxidase. De vacuolaire ATPases, oftewel de V-type ATPases, vormen een familie van protonenpompen die intracellulaire verzuring verzorgen. De energie die hier voor nodig is komt uit de hydrolyse van ATP. In sommige prokaryoten kan V-type ATPase ook ATP synthetiseren door van een ionengradiënt gebruik te maken. Het A-type ATPase uit archaea lijkt wat de structuur betreft meer op het V-ATPase dan op het F-ATPase. Deze laatste is wat de structuur betreft goed bestudeerd. Van de meeste subeenheden weten we de structuur met atomaire oplossing en er is ook veel kennis verzameld over veranderingen in de conformatie die plaatsvinden tijdens de katalyse. Van slechts van twee van de ATPase subeenheden kennen we de atomaire structuur nog niet. Dit zijn de membraangebonden subeenheden a en b. De laatste is in twee kopieën aanwezig die een dimeer vormen. Van de atomaire structuur van de meeste A- and V-ATPases weten we nog veel minder. Zelfs bij lage resolutie is de organisatie van de subeenheden die in het steelgebied van de A- en V-ATPase zitten nog niet duidelijk.

**Hoofdstuk I** geeft een uitgebreid overzicht over de huidige stand van kennis over F-, A- and V-ATPases. Studies over de structuur en de relatie tussen en structuur en functie van het F-type ATPase/ATP synthase hebben uitgewezen dat dit enzym als een reversibele rotatiemotor werkt. Genetische gegevens suggereren dat er een nauwe relatie is tussen de belangrijkste katalytische subeenheden van de F-, A- and V-ATPases. Maar aan de andere kant hebben sommige andere subeenheden van de V- and A-ATPases geen duidelijke genetisch verwante eiwitten in het F-ATPase. Dit is vermoedelijk ook de reden waarom er verschillen zijn in organisatie en regulatie tussen de verschillende types enzymen.

In **Hoofdstuk II** wordt de zuivering beschreven van het V-ATPase complex uit de thermofiele bacterie *Caloramator fervidus*. Deze bacterie pompt overigens geen protonen maar  $Na^+$  ionen. Na zuivering werd dit enzym gedissocieerd onder gecontroleerde condities. Van een aantal kleinere en opgezuiverde  $V_1$ -ATPase complexen werd de tweedimensionale structuur en de subeenheidsamenstelling bepaald. In totaal werden 50000 elektronenmicroscopieprojecties geselecteerd en uitgewerkt met losse deeltjes analyse. De 2D-mappen van de subcomplexen en het native complex werden onderling vergeleken en hieruit kon de vorm en positie van twee subeenheden in the centrale steel worden bepaald. De bovenste is langwerpig van vorm en is

gedeeltelijk in het centrale deel van de  $V_1$  kop gepositioneerd. De vorm en positie lijken sterk op die van de  $\gamma$  subeenheid van de F-ATPases. Uit vergelijking van de gelelectroforesepatronen werd duidelijk dat er twee kandidaten voor deze massa waren, namelijk de subeenheden D en E. De massa's van deze subeenheden zoals berekend uit de DNA-volgorde van *Enterococcus hirae* verschillen niet al te veel. Vandaar dat op grond van kleine verschillen in het electroforesepatroon niet met 100% zekerheid te bepalen was of het om E of om D ging. Maar subeenheid E was de meest waarschijnlijke kandidaat. Dat het om subeenheid E moest gaan is later door de groep van Dr. J. Lolkema bevestigd door volgordebepaling van het DNA van *Caloramator fervidus* (zie discussie). De onderste massa was veel groter en kon op grond van electroforesepatronen worden toegekend aan subeenheid C. Deze subeenheid verbindt subeenheid E met het membraangebonden  $V_0$  deel. Door de aanwezigheid van subeenheid C is de centrale steel een stuk langer dan die van de F-ATPases. Deze ATPases hebben geen subeenheid die homoloog is aan C. De  $\gamma$  subeenheid is rechtstreeks aan de  $F_0$  subeenheden verbonden.

**Hoofdstuk III** beschrijft reconstitutie-experimenten met de E en G subeenheden van V-ATPase uit de gist *Saccharomyces cerevisiae* en de  $\alpha$  en  $\beta$  subeenheden van F1-ATPase geïsoleerd uit de thermofiele bacterie *Bacillus PS3* (TF<sub>1</sub>). Door reconstitutie werd een hybridecomplex verkregen dat bestond uit drie  $\alpha$  en drie  $\beta$  subeenheden en een E en G subeenheid. Het hybride complex had 53% van de activiteit van het natieve ATPase uit TF<sub>1</sub>. Het  $\alpha_3\beta_3EG$  werd met elektronenmicroscopie gekarakteriseerd en 40000 projecties werden met beeldverwerking geanalyseerd. Uiteindelijk werden enkele 2D-projecties verkregen met een resolutie van 1,2–2,4 nm, die het hybride complex in diverse posities laten zien. Bovenanzichten en zijaanzichten werden vergeleken met projecties van het atomaire model van het  $\alpha_3\beta_3$  subcomplex van TF<sub>1</sub>. Verschilplaatjes laten zien dat er een extra (zevende) massa is in het centrum van de  $\alpha_3\beta_3$  structuur, die aan een kant uitsteekt. De verschilplaatjes van het  $\alpha_3\beta_3EG$  complex met de projecties van de  $A_3B_3E$  en  $A_3B_3EC$  subcomplexen van  $V_1$  uit *Caloramator fervidus* laten zien dat de massa binnen de  $\alpha_3\beta_3$  structuur uit de E subeenheid bestaat. De G subeenheid vormt in ieder geval een deel van de steel dat verder naar buiten uitsteekt. De vorming van een actief  $\alpha_3\beta_3EG$  hybride complex suggereert dat in het  $\alpha_3\beta_3$  subcomplex van F1 de  $\gamma$  subeenheid op effectieve wijze kan worden vervangen door de E subeenheid van het V-ATPase. Deze resultaten laten zien dat de E en  $\gamma$  subeenheden een gelijke structuur hebben, ondanks het feit dat hun genen weinig homologie vertonen.

**In Hoofdstuk IV** presenteren we de analyse van een ander hybride complex, dat bestaat uit de  $V_1$  kop van de worm *Manduca sexta*, waarvan de C subeenheid is verwijderd en de subeenheid C (Vma5p) van het enzym uit bakkergist *Saccharomyces cerevisiae*. Projecties van dit gezuiverde hybride complex werden wederom met losse-deeltjes elektronenmicroscopie bepaald.  $V_1$ -Vma5p bestaat uit een kop met een lange wigvormige steel met een globulair domein met afmetingen van 9,5 bij 7,5 nm en een knobbel van 2,1 bij 3,0 nm. Het globulaire domein wordt verondersteld de Vma5p subeenheid te bevatten. Door middel van chemische modificatie werd onderzocht welk deel aan de buitenkant van de Vma5p subeenheid interactie met andere subeenheden heeft.

**In Hoofdstuk V** wordt de eerste projectie structuur van een intact  $A_1A_0$  ATP synthase uit een archaeobacterie gepresenteerd. Dit complex was geïsoleerd uit *Methanococcus jannaschii*. Met behulp van elektronenmicroscopie en losse deeltjes analyse werden tweedimensionale projectiemappen met een resolutie van 1,8 nm bepaald. Het enzym heeft een totale lengte van 25,9 nm en bestaat uit een kopgroep genaamd  $A_1$  met afmetingen van 9,4 bij 11,5 nm en een membraangebonden  $A_0$  domein van 6,4 bij 10,6 nm. Deze zijn met elkaar verbonden door een centrale steel met een lengte van ongeveer 8 nm. De centrale steel is gedeeltelijk omringd door een

horizontaal lopende staafvormige structuur die de vorm van een kraag heeft. Deze kraag maakt contact met een perifere steel die loopt van het  $A_0$  domein tot aan de top van de  $A_1$  kop en met een tweede structuur die de kraag met de  $A_1$  kop verbindt. Door middel van superpositie hebben we onze mappen vergeleken met een lage-resolutie drie-dimensionale elektronenmicroscopie-reconstructie en met een structuur in oplossing van het  $A_1$  complex van *Methanosarcina mazei* Gö1, die bepaald is met behulp van Röntgen-kleinhoekverstrooiing. Deze vergelijking geeft inzicht in de opbouw van het  $A_1A_0$  ATP synthase complex, uit de verschillende onderdelen, zoals de kopgroep en de centrale en perifere steel. hoe de verschillende onderdelen, zoals de centrale en perifere steel.

In **Hoofdstuk VI** worden de resultaten die in dit proefschrift staan beschreven samengevat en van commentaar voorzien. We laten ook een vergelijking zien van de projectiemappen van V-ATPase complexen met een nieuwe 3D map van subeenheid d. Met deze map en cross-link gegevens is het nu mogelijk om de positie van subeenheid F in de centrale steel aan te geven. De posities van de andere subeenheden uit het steelgebied wordt ook bediscussieerd met de nieuwste gegevens.